

**Untersuchungen über die Cholinesterase-Restaktivität
von 50 menschlichen Seren bei Vergiftung mit E 600
unter Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat**

von

JOACHIM MARQUART

aus Mühlacker



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548408_0015

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg
Ehemaliger Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Untersuchungen über die Cholinesterase-Restaktivität
von 50 menschlichen Seren bei Vergiftung mit E 600
unter Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

JOACHIM MARQUART

aus Mühlacker

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. L. Demling

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: em. Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 1973

M e i n e n E l t e r n

i n D a n k b a r k e i t

g e w i d m e t

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I Einleitung	4
II Problemstellung	7
III Experimentelle Untersuchungen	
1. Versuchsanordnung	7
2. Versuchsergebnisse	10
3. Auswertung	15
IV Diskussion und Zusammenfassung	16
V Literaturverzeichnis	17

I. Einleitung

Zur Charakterisierung der Toxizität von Alkylphosphaten wird oft die molare Konzentration an Wirkstoff angegeben, die in der Lage ist die Aktivität von Cholinesterasen auf die Hälfte zu erniedrigen (I_{50}). Dieser Wert ist von der Art der Cholinesterase sowie auch den Versuchsbedingungen abhängig. Für E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) und Serumcholinesterasen sind in der Literatur Werte entsprechend Tabelle I genannt.

Tabelle I

I_{50} - Werte für Serumcholinesterasen verschiedener Herkunft (aus der Literatur)

Herkunft des Serums	I_{50}	Autor
?	$1,4 \times 10^{-7}$	Schrader (1963)
Pferd	$1,4 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Ratte	$2,63 \times 10^{-8}$	Heath (1961)
?	$1,26 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Mensch	$0,87 \times 10^{-8}$	Rosival u. Mitarb. (1959)

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1972) haben nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff festgestellt. Bei Messung der Cholinesteraseaktivität von

192 menschlichen Seren nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration fanden sie unabhängig von der Ausgangsaktivität eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität (siehe Tabelle II).

Tabelle II

Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Normalaktivität von 192 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M).

n	Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität	
		gemessene Werte	mittlere Restaktivität mit Standardabweichung
128	I	0,0- 6,0	$2,5 \pm 1,1$
46	II	12,0-22,0	$17,2 \pm 2,2$
18	III	30,0-55,0	$39,6 \pm 5,1$

Die gefundenen Unterschiede in der Restaktivität der Serum-Cholinesterasen nach Inkubation in vitro mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in bestimmter Konzentration, warfen eine Reihe von Fragen auf, besonders nach den Ursachen, der Verteilung in der Bevölkerung und einer eventuellen genetischen Bedingtheit. Wie GELD-MACHER-v.MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (1972) bei 50 Versuchspersonen zeigten, besteht zwischen Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 und der Aktivität der Serum-Arylesterase

(Paraoxonase, E.C.3.1.1.2.) eine hochsignifikante Korrelation, derart, daß eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraoxonasen-Aktivität entspricht. Die Unterschiede in der Serumcholinesterasen-Restaktivität sind demnach wohl auf unterschiedliche Serumpaaronasen-Aktivitäten zurückzuführen.

Nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PETENYI, FLÜGEL, BURGIS, DIETZEL, METZNER, NIRSCHL und RENNER ist die menschliche Serum-Paraoxonase ein sehr spezifisches Enzym, das schon auf geringfügige Veränderungen am Substratmolekül reagiert. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER haben gezeigt, daß die menschliche Serum-Paraoxonase einen Polymorphismus aufweist. Wie Untersuchungen an 35 Familien mit 52 Kindern ergaben ist dieser wahrscheinlich genetisch determiniert und folgt einem einfachen 2-Allele-Modell.

II. Problemstellung

Um die Verteilung der gefundenen Unterschiede der Restaktivität der Serum-Cholinesterasen in der Bevölkerung zu erforschen, wurde in der vorliegenden Arbeit Serum von 50 Probanden nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration untersucht. Als Substrat wurde Butyrylcholinjodid verwendet (OBIRI, 1973).

III. Experimentelle Untersuchungen

1. Versuchsanordnung

Methodik zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität mit Butyrylcholinjodid als Substrat (in der Warburg-Apparatur).

a. Gewinnung des Serums:

Als Probanden wurden gesunde, nicht verwandte Personen, im Alter zwischen 17 und 51 Jahren genommen. Sie waren etwa zur Hälfte männlichen und weiblichen Geschlechts und setzten sich aus Blutspendern der Erlanger Blutbank und Studenten der Universität Erlangen-Nürnberg zusammen.

Ihnen wurde 10 ml Blut entnommen, das etwa 1/2 Stunde nach der Entnahme 15 min bei 1600 U/min zentrifugiert wurde, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden durfte. Das erhaltene Serum wurde sofort abgetrennt und spätestens nach zwei Tagen die Messungen durchgeführt.

b. Angewandtes Meßverfahren:

Die Serum-Cholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgende Aktivitätsmessung abgestimmt.

c. Inkubation mit E 600 (Paraaxon):

Für die Vergiftung des Fermentes wurden 1 μ l E 600 auf 90 ml H₂O gegeben. Je 10 μ l dieser Lösung wurden dann zu 13,5 ml der als Verdünnungslösung für das Serum verwendeten Salzlösung, gebracht. Diese Verdünnungslösung war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 % igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 % igen NaHCO₃-Lösung. Vor Gebrauch wurde sie mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ durchströmt.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung verdünnt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war $c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar.

Die Ansätze wurden sofort in ein Wasserbad von 37° C gebracht. Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,546 % igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt. Die Warburggefäße wurden nun an Manometer angeschlossen und 20 min in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ begast. Nach dem Begasen wurde noch so lange bei 37°C inkubiert,

daß eine Gesamt-Inkubationszeit von 60 min erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (SÜLLMANN, 1964).

d. Messung der Cholinesteraseaktivität:

Nach beendeter Inkubation wurde die Serumverdünnung der Anhangsbirne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (SÜLLMANN, 1964).

Es wurde beigeöffneten Hähnen 3 min geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min) und anschließend die Manometerhähne geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann 30 min lang alle 15 min abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmungen mit und ohne E 600 bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat auf ihre Restaktivität getestet. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, in welchen die Anhangsbirne des Kölbchens nur Verdünnungslösung enthielt, wodurch die Eigenhydrolyse des Substrates erfaßt wurde.

Diese Doppelbestimmungen wurden zweimal durchgeführt, sodaß in zwei Versuchsabläufen drei Seren mit jeweils insgesamt vier Leerwerten, vier unvergifteten und vier vergifteten Ansätzen auf ihre Restaktivität geprüft wurden.

Es wurde darauf geachtet, daß der Anstieg der Manometersäulen linear erfolgte. War diese Forderung erfüllt, wurden die 30 min-Werte der Doppelmessung mit den entsprechenden Manometerkonstanten (SÜLLMANN, 1964) multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetische Mittel beider Wertepaare gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Auf die gleiche Weise wurde der zweite Versuchslauf ausge-

wertet und aus beiden Ergebnissen wiederum das arithmetische Mittel gebildet.

Die Angabe der Aktivität erfolgt in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, bezogen auf 0,15 ml Serum.

2. Versuchsergebnisse

Die an den 50 Personen gewonnenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt und in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Tabelle III

V Versuchsergebnisse der Messungen der Serum-Cholinesterase-Aktivität mit dem Substrat Butyrylcholinjodid ohne und mit Vergiftung mit E 600 bei 50 Versuchspersonen.

Versuchspersonen	Alter Jahre	Geschl. m./w.	Blut- gruppe Rh.	Mittelwert der Restaktivität in % der Normalaktivität nach Vergiftung
------------------	----------------	------------------	------------------------	--

Niedriger Typ = Gruppe I

Herming Rolf-D.		m	B pos	0,47
Szüner Lorand	22	m		0,54
Hermann Herbert	41	m	O pos	0,65
Hamm Lothar	26	m	A ₁ pos	0,67
Veranić Thea	17	w		0,69
Willburger Edeltr.	24	w		1,16
Mehrer Ernst		m	A ₁ pos	1,23
Thoms Peter	33	m	B pos	1,23
Vrassmann Hans	51	m		1,44
Nitschke Helmut	34	m	O pos	1,49
Vetter Hans-Jürg.	25	m		1,58
Klein Marianne	23	w		2,52
Marquart Joachim	26	m	O pos	2,80
Haberzettl Goth.	22	m	A ₁ pos	2,97
Fischer Heidrun	28	w	A ₁ pos	3,18
Stumpf Hans	35	m	A ₁ neg	3,32
Hryly Herbert	47	m		3,48
Walther Gerhard	41	m	B pos	3,70

Pobst Hans	46	m	A ₁ pos	4,00
Hummel Siegfried	21	m	O pos	4,09
Stadler Renate	27	w		4,10
Byna Horst	27	m	O pos	4,43
Mayer Max	39	m		4,48
Büttner Hans-W.	24	m	B neg	4,49
Winckler Walter	27	m	A ₁ B pos	4,71
Tschepe Heidrun	23	w		4,85
Klinger Barbara	24	w		5,20
Feder Rudolf	29	m	A ₁ pos	5,26
Goblirsch Elfriede	25	w		5,37
Scheder Friedrich	38	m	A ₁ neg	5,42

Mittlerer Typ = Gruppe II

Löslein Hans		m	B pos	10,44
Fröbel Günther	41	m	A ₁ pos	11,01
Roth Harald	23	m		11,52
Simon Barbara	24	w		12,27
Fischer Erich	31	m		16,89
Lassmann Ingeborg	23	w		18,36
Hentzel Johanna	33	m	A ₂ pos	18,90
Uffinger Werner	38	m	A ₁ pos	19,01
Meixner Ingrid	22	w	A ₂ pos	22,17
Wagner Marianne	45	w	A ₁ neg	23,59

Hoher Typ = Gruppe III

Stoian Helga	37	w		27,93
Schröder Ursula	27	w		28,41
Linsenmeyer Mina	44	w		31,70
Popp Gerlinde	34	w	B pos	34,64

Schwarz Hubert	26	m		36,77
Rieger Christian	30	m		46,41
Scipio Gerhard	28	m	A ₁ B pos	48,98
Just Lore	44	w	O pos	51,51
Wurm Aloisia	22	w		56,32

Tabelle IV

Normalaktivität der untersuchten Seren in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min.}$

Niedriger Typ = Gruppe I

Herming Rolf-D.	165	Stumpf Hans	204
Szüner Lorand	146	Hryly Herbert	216
Hermann Herbert	200	Walther Gerhard	167
Hamm Lothar	161	Pobst Hans	308
Veranić Thea	144	Hummel Siegfried	166
Willburger Edeltr.	180	Stadler Renate	144
Mehrer Ernst	209	Byna Horst	215
Thoms Peter	192	Mayer Max	173
Vrassmann Hans	219	Büttner Hans-W.	163
Nitschke Helmut	222	Winckler Walter	214
Vetter Jürgen	194	Tschepe Heidrun	117
Klein Marianne	188	Klinger Barbara	213
Marquart Joachim	146	Feder Rudolf	213
Haberzettl Gotth.	234	Goblirsch Elfride	166
Fischer Heidrun	116	Scheder Friedrich	94

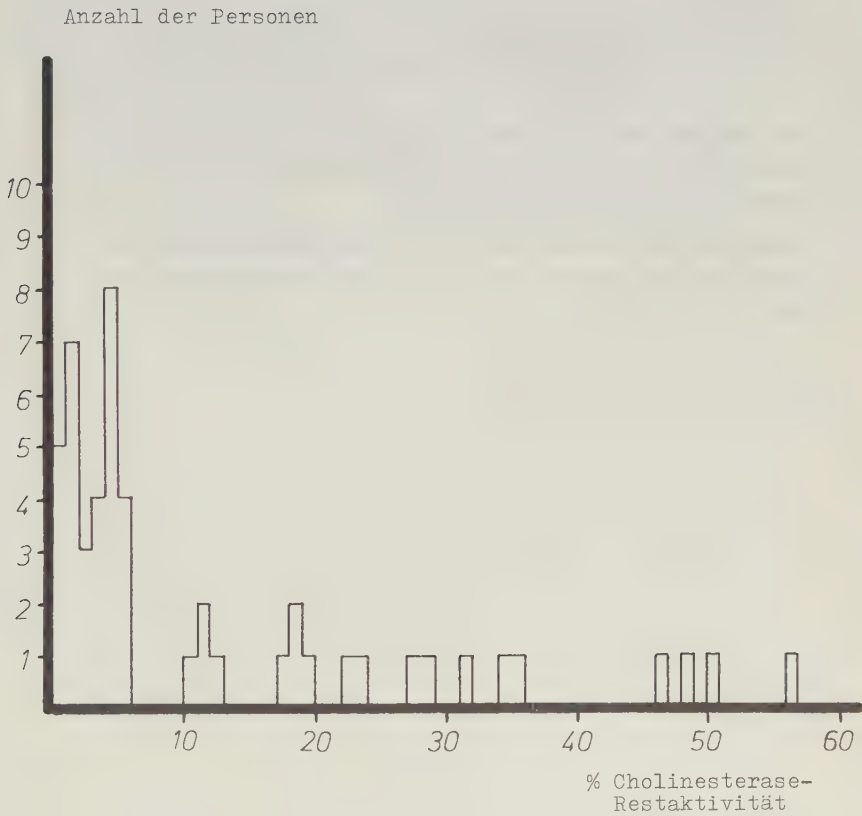
Mittlerer Typ = Gruppe II

Löslein Hans	244	Lassmann Ingeborg	146
Fröbel Günther	213	Hentzel Johanna	110
Roth Harald	191	Uffinger Werner	184
Simon Barbara	97	Meixner Ingrid	158
Fischer Erich	161	Wagner Marianne	159

Hoher Typ = Gruppe III

Stoian Helga	144	Rieger Christian	177
Schröder Ursula	167	Scipio Gerhard	197
Linsenmeyer Mina	196	Just Lore	171
Popp Gerlinde	127	Wurm Aloisia	208
Schwarz Hubert	157		

Abb. 1: Gesamtverteilung
der Cholinesterase-Restaktivität
von 50 nicht verwandten Personen



3. Auswertung

Die einzelnen Gruppen ließen sich unter Verwendung von Butyrylcholinjodid gut unterscheiden, wobei die Gruppe niedriger E 600-spaltender Aktivität eine durchschnittliche Restaktivität von 2,95 %, die mittlere Gruppe eine durchschnittliche Restaktivität von 16,42 % und die hohe Gruppe von 40,30 % aufwies.

Verteilung:

niedriger Typ	31 Personen = 62 %
mittlerer Typ	10 Personen = 20 %
hoher Typ	9 Personen = 18 %

Von einigen der Probanden liegen die Blutgruppen vor. Eine statistische Auswertung kommt aber wegen der geringen Anzahl nicht in Betracht.

Zwischen der Normalaktivität und der Zugehörigkeit zu einer der drei Typen kann kein Zusammenhang festgestellt werden.

IV. Diskussion und Zusammenfassung

Die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF und RABAST (1969) gefundenen Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterasen mit dem Alkylphosphat E 600 sind wahrscheinlich genetisch gesteuert.

Familienuntersuchungen zur Klärung dieser Frage und auch die Festlegung der drei Paraoxonase-Typen in der Bevölkerung sind mit Butyrylcholinjodid schnell und sicher möglich.

Die vorliegenden Werte sind ein Beitrag zur Aufklärung der Verteilung der drei Paraoxonase-Typen in der Bevölkerung.

V. Literaturverzeichnis

1. AMMON, R.:
Die fermentative Spaltung des Acetylcholins
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)
2. FRIEDBERG, K.D. und F.SAKAI:
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Al-
kylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut
und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreak-
tivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyl-
jodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)
3. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., W. BAUMGARTNER,
M. PETENYI, H. BURGIS, H.H. LINDORF und
H. METZNER:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Ver-
giftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600
und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-
Systems in menschlichen Seren
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)
4. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
-Cholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6.-9.10.1969

5. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., H.H. LINDORF,
M. PETENYI, M. FLÜGEL, TH. FISCHER und TH. HILLER:
Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraoxonase (E.C.3.1.1.2.)
6. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., M. PETENYI, M. FLÜGEL,
H. BURGIS, E. DIETZEL, M. METZNER, H.NIRSCHL und
O. RENNER:
Zur Spezifität der menschlichen Serumparaoxonase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck
7. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-
-(p-nitrophenyl)-phosphat)
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
8. HEATH, D.F.:
Organophosphorus poisons.
Oxford-London-New York-Paris: Pergamon 1961
9. KIMMERLE, G. und D. LORKE:
Die Toxikologie der insektiziden Phosphosäureester
Pflanzenschutznachrichten Bayer 21, 111 (1968)
10. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
-phosphat (E 600) durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1967)

11. OBIRI:
Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der unterschiedlichen Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).
Erlangen, Med. F. Diss. (1973)
12. ROSIVAL, VROBOVSKY and SELECKY:
Toxikologia a farmakoboiddynamika organo-fosforovich zlucenin, Bratislava 1959
Zit. nach KIMMERLE und LORKE, 1968
13. SCHRADER, G.:
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-ester.
Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie, 1963
14. SÜLLMANN, E.:
Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebestoffwechsels
In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, hrsg. von K. Lang und E. Lehnartz, Bd. VI A, Teil A. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer 1964
15. WHITTAKER, M.:
The pseudocholinesterase variants. Differentiation by means of alkyl alcohols
Acta genet. (Basel) 18, 325 (1968)

Herrn Prof.Dr.Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt bedanke ich mich besonders herzlich für die Überlassung des Themas und für ihre stets in übergroßem Maße gewährte freundliche Hilfe.

Frau M. Pétenyi bin ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dankbar.

Lebenslauf

Am 14. Juni 1947 wurde ich als Sohn der Eheleute Lore Berta Else Marquart, geborene Melzer und Heinrich Marquart in Pforzheim geboren.

Vom März 1954 bis März 1958 besuchte ich die Ulrich von Dürrmenz-Schule (Volksschule) in Mühlacker und anschließend bis Oktober 1966 das Gymnasium Mühlacker.

Von Januar 1967 bis zum April 1968 habe ich meinen Dienst bei der Bundeswehr abgeleistet.

Im Mai 1968 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Zahnmedizin. Hier bestand ich im März 1969 das Vorphysikum, im September 1970 das Physikum und im April 1973 das zahnmedizinische Staatsexamen.

Im Mai 1971 begann ich gleichfalls an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Medizin und bestand im August 1971 das Physikum.



Buchdruckerei Ludwig Müller - 852 Erlangen, Fahrstraße 5